

# **BAB I**

## **PENDAHULUAN**

### **A. Latar Belakang Masalah**

Senyawa flavonoid adalah senyawa polifenol yang mempunyai 15 atom karbon yang tersusun dalam konfigurasi  $C_6-C_3-C_6$ , yaitu dua cincin aromatik yang dihubungkan oleh 3 atom karbon yang dapat atau tidak dapat membentuk cincin ketiga. Flavonoid terdapat dalam semua tumbuhan hijau sehingga dapat ditemukan pada setiap ekstrak tumbuhan (Markham, 1988). Golongan flavonoid dapat digambarkan sebagai deretan senyawa  $C_6-C_3-C_6$ , artinya kerangka karbonnya terdiri atas dua gugus  $C_6$  (cincin benzena tersubstitusi) disambungkan oleh rantai alifatik tiga karbon (Robinson, 1995).

Tumbuhan yang mengandung flavonoid banyak dipakai dalam pengobatan tradisional. Hal tersebut disebabkan flavonoid mempunyai berbagai macam aktivitas terhadap macam-macam organisme (Robinson, 1995). Penelitian farmakologi terhadap senyawa flavonoid menunjukkan bahwa beberapa senyawa golongan flavonoid memperlihatkan aktivitas seperti antifungi, diuretik, antihistamin, antihipertensi, insektisida, bakterisida, antivirus dan menghambat kerja enzim (Geissman, 1962).

Flavonoid merupakan kandungan khas tumbuhan hijau dan salah satu senyawa aktif yang menjadi penelitian peneliti dalam mengembangkan obat

tradisional Indonesia. Hal penting dari penyebaran flavonoid dalam tumbuhan adalah adanya kecenderungan kuat bahwa tumbuhan yang secara taksonomi berkaitan akan menghasilkan flavonoid yang jenisnya serupa. Jadi informasi tumbuhan yang diteliti seringkali didapatkan dengan melihat pustaka mengenai flavonoid terdahulu dalam tumbuhan yang berkaitan, misalnya dari marga atau suku yang sama (Markham, 1988).

Daun ceremai mengandung senyawa saponin, flavonoid, tanin dan polifenol. (Dalimartha, 1999). Berdasarkan uraian di atas dan kandungan dari daun ceremai, maka dilakukan penelitian yang bertujuan untuk mengisolasi dan mengidentifikasi flavonoid dari daun ceremai.

### **B. Perumusan Masalah**

Berdasarkan uraian diatas dapat dirumuskan suatu permasalahan sebagai berikut:

1. Apakah kromatografi lapis tipis dan spektrofotometri dapat digunakan untuk mengisolasi dan mengidentifikasi flavonoid?
2. Bagaimanakah struktur parsial senyawa flavonoid dari daun ceremai?

### C. Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi dan mengidentifikasi kandungan flavonoid dari daun ceremai (*Phyllanthus acidus* [L.] Skeels.) dengan menggunakan metode kromatografi lapis tipis dan spektrofotometri ultraviolet.

### D. Tinjauan Pustaka

#### 1. Uraian Tentang Tumbuhan Ceremai

##### a. Nama daerah

##### 1) Sinonim

*P. distichus* Muell. Arg., *P. cicca* Muell. Arg., *Cicca disticha* Linn., *C. nodiflora* Lamk., *C. acida* (L.) Merr., *Averrhoa acida* L.

##### 2) Nama daerah

Sumatera: ceremai (Aceh), cerme (Gayo), ceremai (Melayu), camin-camin (Minangkabau). Jawa: careme, cerme (Sunda), cerme (Jawa). Nusa Tenggara: carmen, cermen (Bali), careme (Madura), sarume (Bima). Sulawesi: lumpias aoyok, tili (Gorontalo), lombituko bolaano (Buol), caramele (Makasar, Bugis), carameng. Maluku: ceremin (Ternate), selemele, selumelek (Roti), salmele, cermele (Timor).

##### 3) Nama asing

Cheramelier (P), country gooseberry (I).

#### 4) Nama simplisia

*Phyllanthi acidi Folium* (daun ceremai) (Dalimartha, 1999).

##### b. Klasifikasi Tumbuhan Ceremai

Klasifikasi tumbuhan ceremai (*Phyllanthus acidus* [L.] Skeels.) adalah sebagai berikut:

Divisi	: Spermatophyta
Sub divisi	: Angiospermae
Kelas	: Dicotyledoneae
Bangsa	: Euphorbiales
Suku	: Euphorbiaceae
Marga	: <i>Phyllanthus</i>
Jenis	: <i>Phyllanthus acidus</i> [L.] Skeels (Hutapea, 1994).

##### c. Kandungan Kimia Tumbuhan Ceremai

Kandungan kimia yang terdapat pada tumbuhan ceremai adalah sebagai berikut: daun, kulit batang dan kayu ceremai mengandung saponin, flavonoid, tanin, dan polifenol. Akar mengandung saponin, asam galus, zat samak, dan zat beracun (toksik). Sedangkan buah mengandung vitamin C (Dalimartha, 1999).

##### d. Deskripsi Tumbuhan Ceremai

Deskripsi tumbuhan ceremai adalah sebagai berikut: pohon kecil, tinggi sampai 10 m, kadang lebih. Percabangan banyak, kulit kayunya tebal. Daun tunggal, bertangkai pendek, tersusun dalam tangkai membentuk rangkaian seperti daun

majemuk. Helai daun bundar telur sampai jorong, ujung runcing, pangkal tumpul sampai bundar, tepi rata, pertulangan menyirip, permukaan licin tidak berambut, panjang 2-7 cm, lebar 1,5-4 cm, warna hijau muda. Tangkai bila gugur akan meninggalkan bekas yang nyata pada cabang. Perbungaan berupa tandan yang panjangnya 1,5-12 cm, keluar di sepanjang cabang, kelopak bentuk bintang, mahkota merah muda. Terdapat bunga betina dan jantan dalam satu tandan. Buahnya buah batu, bentuknya bulat pipih, berlekuk 6-8, panjang 1,25-1,5 cm, lebar 1,75-2,5 cm, warnanya kuning muda, berbiji 4-6, rasanya asam. Biji bulat pipih berwarna cokelat muda (Dalimartha, 1999).

#### **e. Ekologi dan Penyebaran Tumbuhan Ceremai**

Ekologi dan penyebaran tumbuhan ceremai adalah sebagai berikut: pohon ini berasal dari India, dapat tumbuh pada tanah ringan sampai berat dan tahan akan kekurangan atau kelebihan air. Ceremai banyak ditanam orang di halaman, di ladang dan tempat lain sampai ketinggian 1.000 m dpl (Dalimartha, 1999).

#### **f. Manfaat Tumbuhan Ceremai**

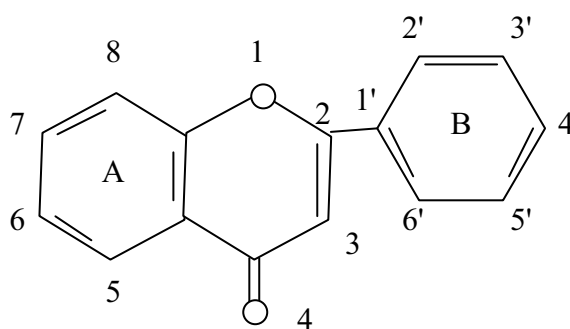
Daun ceremai berkhasiat untuk batuk berdahak, menguruskan badan, mual, kanker, dan sariawan. Kulit akar berkhasiat untuk mengatasi asma dan sakit kulit. Biji berkhasiat untuk mengatasi sembelit dan mual akibat perut kotor (Dalimartha, 1999).

## 2. Uraian Mengenai Flavonoid

### a. Pengertian dan Kerangka Dasar Flavonoid

Senyawa flavonoid adalah senyawa polifenol yang mempunyai 15 atom karbon yang tersusun dalam konfigurasi  $C_6-C_3-C_6$ , yaitu dua cincin aromatik yang dihubungkan oleh 3 atom karbon yang dapat atau tidak dapat membentuk cincin ketiga. Flavonoid terdapat dalam semua tumbuhan hijau sehingga dapat ditemukan pada setiap ekstrak tumbuhan (Markham, 1988). Golongan flavonoid dapat digambarkan sebagai deretan senyawa  $C_6-C_3-C_6$ , artinya kerangka karbonnya terdiri atas dua gugus  $C_6$  (cincin benzena tersubstitusi) disambungkan oleh rantai alifatik tiga karbon (Robinson, 1995).

Kelas-kelas yang berlainan dalam golongan ini dibedakan berdasarkan cincin hetero siklik-oksigen tambahan dan gugus hidroksil yang tersebar menurut pola yang berlainan. Flavonoid sering terdapat sebagai glikosida. Golongan terbesar flavonoid berciri mempunyai cincin piran yang menghubungkan rantai tiga karbon dengan salah satu dari cincin benzena. Sistem penomoran flavonoid dapat dilihat pada gambar 1.



Gambar 1. Penomoran flavonoid

### **b. Penyebaran flavonoid**

Flavonoid merupakan kandungan khas tumbuhan hijau dengan mengecualikan alga. Flavonoid sebenarnya terdapat pada semua bagian tumbuhan termasuk daun, akar, kayu, kulit, tepung sari, nectar, bunga, buah, dan biji. Penyebaran jenis flavonoid pada golongan tumbuhan yang terbesar, yaitu angiospermae (Markham, 1988)

Segi penting dari penyebaran flavonoid dalam tumbuhan ialah adanya kecenderungan kuat bahwa tetumbuhan yang secara taksonomi berkaitan akan menghasilkan flavonoid yang jenisnya serupa. Jadi, informasi yang berguna tentang jenis flavonoid yang mungkin ditemukan pada tumbuhan yang sedang ditelaah sering kali dapat diperoleh dengan melihat pustaka mengenai telaah flavonoid terdahulu dalam tumbuhan yang berkaitan, misalnya dari marga atau suku yang sama (Markham, 1988).

Pada tumbuhan tinggi, flavonoid terdapat baik dalam bagian vegetatif maupun dalam bunga. Sebagai pigmen bunga flavonoid berperan jelas dalam menarik burung dan serangga penyerbuk bunga. Beberapa flavonoid tak berwarna, tetapi flavonoid yang menyerap sinar UV barangkali penting juga dalam mengarahkan serangga. Beberapa kemungkinan fungsi flavonoid untuk tumbuhan yang mengandungnya adalah pengaturan tumbuh, pengaturan fotosintesis, kerja antimikroba dan antivirus, dan kerja terhadap serangga (Robinson, 1995). Sifat berbagai golongan flavonoid dapat dilihat pada tabel I.

**Tabel I. Sifat berbagai golongan flavonoid (Harborne, 1996)**

<b>Golongan flavonoid</b>	<b>Penyebaran</b>	<b>Ciri khas</b>
Antosianin	Pigmen bunga merah marak, merah senduduk, dan biru, juga dalam daun dan jaringan lain	Larut dalam air, $\lambda$ maks 515-545 nm, bergerak dengan BAA pada kertas
Proantosianidin	Terutama tak berwarna, dalam galih dan daun tumbuhan berkayu	Menghasilkan antosianidin (warna dapat diekstraksi dengan amil alkohol) bila jaringan dipanaskan dalam HCl 2 M selama setengah jam
Flavonol	Terutama ko-pigmen takwarna dalam bunga sianik dan asianik, tersebar luas dalam daun	Setelah hidrolisis, berupa bercak kuning murup pada kromatogram forestall bila disinari dengan sinar UV, maksimal spektrum pada 350-386 nm
Flavon	Seperti flavonol	Setelah dihidrolisis, berupa bercak coklat redup pada kromatogram forestall, maksimal spektrum pada 330-350 nm
Glikoflavon	Seperti flavonol	Mengandung gula yang terikat melalui ikatan C-C bergerak dengan pengembang air, tidak seperti flavon biasa
Biflavonil	Tanwarna, hampir seluruhnya terbatas pada gimnospermae	Pada kromatogram BAA berupa bercak redup dengan RF tinggi
Khalkon dan auron	Pigmen bunga kuning, kadang terdapat juga dalam jaringan lain	Dengan amonia berwarna merah (perubahan warna dapat diamati <i>in situ</i> ), maksimal spektrum 370-410 nm
Flavanon	Tanwarna; dalam daun dan buah (terutama dalam citrus)	Berwarna merah kuat dengan Mg/HCl; kadang-kadang sangat pahit
Isoflavon	Tanwarna; seringkali dalam akar; hanya terdapat dalam satu suku, Leguminosae	Bergerak pada kertas dengan pengembang air; tak ada uji warna yang khas.

### **c. Penggolongan flavonoid**

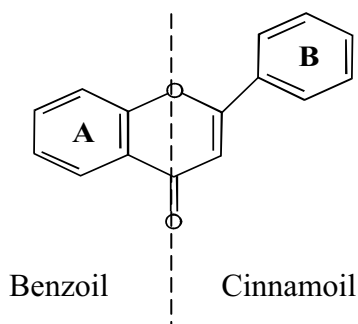
Penggolongan jenis flavonoid dalam jaringan tumbuhan mula-mula didasarkan kepada telaah sifat kelarutan dan reaksi warna. Kemudian diikuti dengan pemeriksaan ekstrak tumbuhan yang telah dihidrolisis, secara kromatografi satu arah, dan pemeriksaan ekstrak etanol secara dua arah. Akhirnya, flavonoid dapat dipisahkan dengan cara kromatografi. Komponen masing-masing diidentifikasi dengan membandingkan kromatografi dan spektrum, dengan memakai senyawa



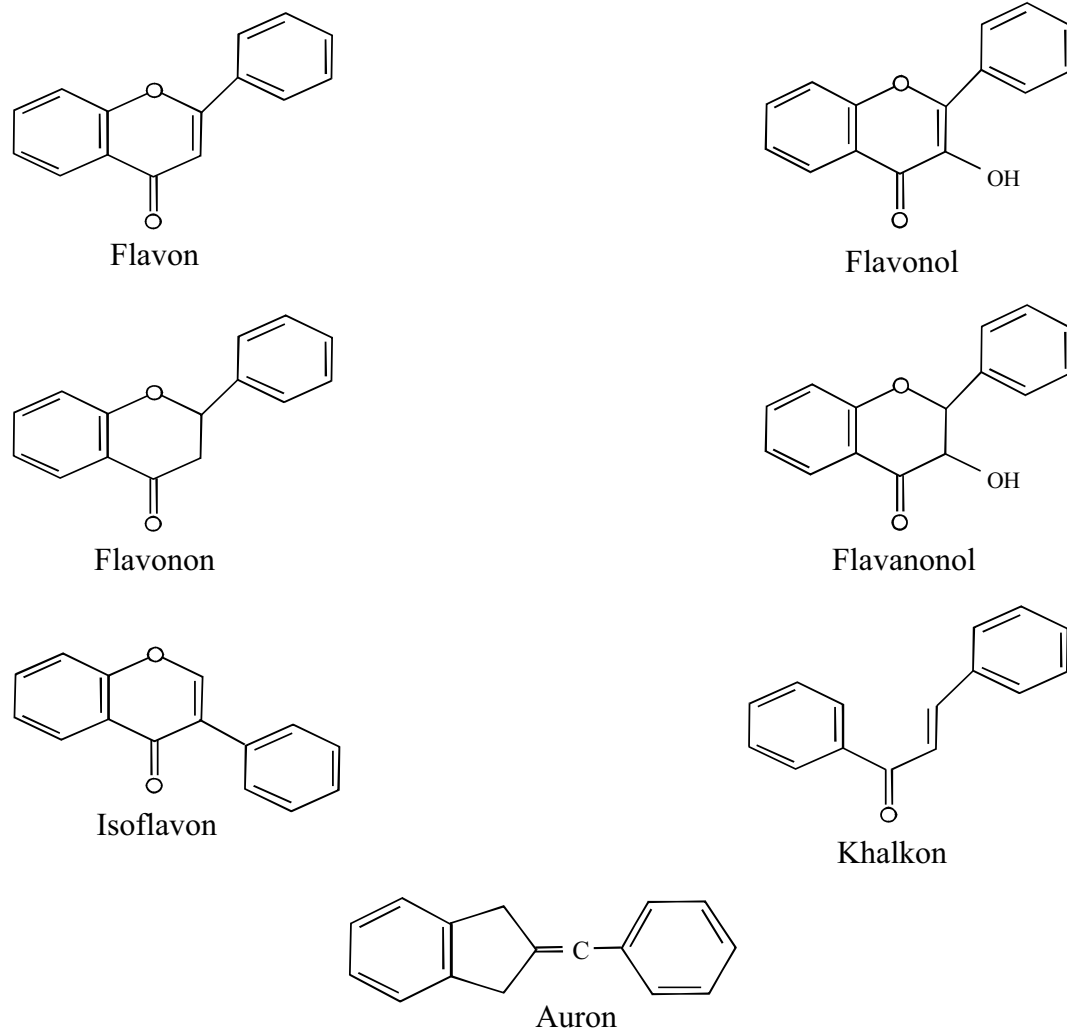
pembandingan yang sudah dikenal. Senyawa baru yang sudah ditemukan sewaktu menelaah memerlukan pemeriksaan kimia dan spektrum yang lebih terinci (Harborne, 1996).

Struktur berbagai tipe atau golongan flavonoid bervariasi sesuai dengan kerangka dasar heterosiklik beroksigen yang dapat berupa gama piron, piron atau pirilium. Kecuali pada auron dan khalkon, siklisasi terjadi antara atom karbon didekat cincin benzen (B) dan satu gugus hidroksil cincin A. Kelas-kelas yang berlainan di flavonoid dibedakan berdasarkan cincin heterosiklik oksigen dan juga hidroksil yang tersebar menurut pola yang berlainan (Robinson, 1991).

Perbedaan di bagian rantai karbon nomor 3 menentukan klasifikasi dari senyawa flavonoid yaitu flavon, flavonol, flavanon, flavanonol, isoflavon, auron dan khalkon. Kerangka flavonoid cincin benzoil dan cinnamoil dapat dilihat pada gambar 2. Kerangka dari tipe-tipe flavonoid dapat dilihat pada gambar 3.



**Gambar 2. Kerangka flavonoid cincin benzoil dan cinnamoil (Mabry, *et al.*, 1970)**



Gambar 3. Kerangka dari tipe-tipe flavonoid (Markham, 1988)

#### d. Ekstraksi dan isolasi senyawa flavonoid

Aglikon flavonoid adalah polifenol dan karena itu mempunyai sifat kimia senyawa fenol, yaitu bersifat agak asam sehingga dapat larut dalam basa. Karena mempunyai sejumlah gugus hidroksil yang tak tersulih, atau suatu gula, flavonoid merupakan senyawa polar dan seperti kata pepatah lama suatu golongan akan melarutkan golongannya sendiri, maka umumnya flavonoid larut cukupan dalam

pelarut polar seperti etanol (EtOH), metanol (MeOH), butanol (BuOH), aseton, dimetilsulfoksida (DMSO), dimetilformamida (DMF), air, dan lain-lain. Sebaliknya, aglikon yang kurang polar seperti isoflavon, flavanon, dan flavon serta flavonol yang termetoksilasi cenderung lebih mudah larut dalam pelarut seperti eter dan kloroform (Markham, 1988).

Idealnya, untuk analisis fitokimia, harus digunakan jaringan tumbuhan segar. Beberapa menit setelah dikumpulkan, bahan tumbuhan harus dicemplungkan ke dalam alkohol mendidih. Kadang-kadang tumbuhan yang ditelaah tidak tersedia dan bahan mungkin harus disediakan oleh seorang pengumpul yang tinggal di benua lain. Dalam hal demikian, jaringan yang diambil segar harus disimpan kering di dalam kantung plastik, dan biasanya akan tetap dalam keadaan baik untuk dianalisis setelah beberapa hari dalam perjalanan dengan pos udara (Harborne, 1996).

Pada prosedur ekstraksi terdapat jalan pintas yang dapat dipelajari dari pengalaman. Misalnya, bila mengisolasi kandungan dari jaringan daun, yang larut dalam air, seharusnya lipid dihilangkan pada tahap dini sebelum pemekatan, yaitu dengan mencuci ekstrak berulang-ulang dengan eter minyak bumi. Kenyataannya, bila ekstrak etanol diuapkan dengan penguap putar, hampir semua klorofil dan lipid melekat pada dinding labu. Dengan keterampilan, pemekatan dapat dilakukan tepat sampai suatu saat tertentu sehingga larutan air yang pekat dapat dipipet hampir tanpa mengandung cecair lemak (Harborne, 1996).

### e. Karakteristik dan identifikasi senyawa flavonoid

Karakteristik flavonoid dapat didasarkan atas reaksi warna dan kelarutannya. Jika tidak ada pigmen yang mengganggu, flavonoid dapat dideteksi dengan uap amonia dan memberikan warna spesifik untuk masing-masing golongan. Reaksi warna flavonoid dapat dilihat pada tabel II. Penafsiran bercak dari segi struktur flavonoid dapat dilihat pada tabel III.

**Tabel II. Reaksi warna flavonoid (Venkataraman, 1962)**

Golongan Flavonoid	Warna			
	Larutan NaOH	HCl pekat	Magnesium/ asam klorida	Natrium amalgam
Khalkon	Jingga sampai merah	Jingga sampai merah	Tak warna	Kuning pucat
Dihidrokhalkon	Tak berwarna	Tak berwarna/ kuning	Tak berwarna	Tak berwarna
Auron	Merah/ violet	Merah/ violet	Tak berwarna	Kuning pucat
Flavanon	Kuning/ jingga dipanaskan merah	Jingga	Merah atau violet atau biru	Merah
Flavon	Kuning	Kuning atau jingga berpendar	Kuning atau jingga berpendar	Merah
Flavonol	Kuning/ jingga	Kuning atau jingga berpendar	Merah/ violet	Kuning/ merah
Flavanonol	Kuning berubah coklat	Kuning/ merah	Merah/ violet	Kuning/ coklat
Leukoantosianin	Kuning	Merah/ violet	Violet	Violet
Antosianin/ Antosianidin	Biru/ violet	Kuning/ jingga	Merah lalu memucat	Kuning/ jingga
Isoflavon	Kuning	Kuning	Kuning	Merah muda atau violet
Isoflavanon	Kuning	Kuning	Tak berwarna	Merah

**Tabel III. Penafsiran bercak dari segi struktur flavonoid (Mabry, *et al.*, 1970)**

Warna bercak flavonoid		
Sinar UV	UV/ NH <sub>3</sub>	Tipe flavonoid
Ungu gelap	Kuning, hijau-kuning atau hijau	a. Biasanya flavon yang mempunyai 5-OH dan 4' OH atau flavonol tersubstitusi pada 3-OH mempunyai 5-OH dan 4-OH b. Kadang-kadang 5-OH flavanon dan 4' OH khalkon tanpa OH pada cincin B
	Perubahan warna sedikit atau tanpa perubahan warna	a. Flavon atau flavonol yang mempunyai 5-OH tetapi tanpa 4' OH atau tersubstitusi b. Isoflavon, dihidroflavonol dan beberapa flavanon yang mempunyai 5-OH c. Khalkon yang mempunyai 2'- atau 6'-OH tetapi tidak mempunyai 2- atau 4-OH bebas
	Biru muda	Kadang-kadang 5-OH flavanon
	Merah atau jingga	Khalkon yang mempunyai 2- dan/atau 4-OH bebas
Fluoresensi biru muda	Fluoresensi hijau-kuning atau hijau-biru	a. Flavon dan flavanon tanpa 5-OH bebas b. Flavonol tanpa 5-OH bebas tetapi mempunyai 3-OH tersebstitusi
	Perubahan warna sedikit atau tanpa perubahan	Isoflavon tanpa 5-OH bebas
	Fluoresensi terang biru muda	Isoflavon tanpa 5-OH bebas
Tak nampak	Fluoresensi biru muda	Isoflavon tanpa 5-OH bebas
Kuning redup dan kuning, atau fluoresensi jingga	Perubahan warna sedikit atau tanpa perubahan	Flavonol yang mempunyai 3-OH bebas dan mempunyai atau tidak mempunyai 5-OH bebas
Fluoresensi kuning, hijau-kuning, hijau-biru	Jingga atau merah	Auron yang mempunyai 4' OH bebas dan beberapa 2- atau 4-OH khalkon
	Perubahan warna sedikit atau tanpa perubahan	a. Auron yang tidak mempunyai 4' OH bebas dan flavanon tanpa 5-OH bebas b. Flavonol yang mempunyai 3-OH bebas dan disertai atau tanpa 5-OH bebas
Kuning pucat	Kuning terang-ungu	Dihidroflavonol yang tidak mempunyai 5-OH bebas

Tabel IV. Warna bercak Flavonoid dengan sinar tampak dan UV<sub>366nm</sub> (Geissman, 1962)

Gol flavonoid	Vis	UV366nm	NH3	NH3 / UV 366nm	AlCl3	AlCl3 / UV366nm	Na2CO3	Na BH4	Ar SO3H
Flavon	kuning merah	coklat gelap, coklat merah, kuning coklat	kuning	kuning terang, kuning hijau, kuning gelap	kuning pucat	fluoresensi hijau, kuning, coklat	kuning terang	tidak berwarna	kuning
Flavonol	kuning merah	kuning terang, kuning hijau, coklat	kuning	kuning terang, kuning hijau, hijau	kuning	fluoresensi kuning hijau	kuning, kuning coklat, biru	tidak berwarna	kuning
Isoflavon	tak berwarna	ungu padam, kuning lemah	tak berwarna	ungu padam, kuning lemah	tak berwarna	fluoresensi kuning	hijau lemah	tidak berwarna	-
Katekin	tak berwarna	tak berwarna	tak berwarna	fluoresensi, biru lemah hitam	tak berwarna	tak berwarna, biru lemah, kuning pucat	-	-	coklat
Flavanon	tak berwarna	tak berwarna	tak berwarna	tak berwarna, kuning gelap kuning hijau	tak berwarna	fluoresensi hijau, kuning, biru pucat	kuning lemah, hijau	magenta	tidak berwarna
Leukoantosianin	tak berwarna	tak berwarna	-	-	-	-	-	-	merah, merah muda, ungu
Antosianin	merah muda, orange, merah jingga	merah padam, ungu, merah muda, coklat	-	-	-	-	-	-	Tidak berwarna
Auron	kuning terang	kuning terang, hijau kuning	orange, orange merah muda	kuning orange, orange, merah, orange coklat	kuning lemah, orange	fluor hijau, hijau kuning, coklat lemah	orange, merah muda, ungu	tidak berwarna	merah muda, orange
Khalkon	coklat, hijau, kuning coklat	coklat, hijau kuning coklat	kuning orange, merah orange, merah muda	orange, merah, ungu, hitam	kuning orange	fluoresensi, orange, coklat, merah muda	orange, coklat merah	tidak berwarna	orange, merah muda

### **3. Metode Penyarian**

Penyarian merupakan peristiwa perpindahan massa zat aktif yang semula berada dalam sel, ditarik oleh cairan penyari sehingga zat aktif larut dalam cairan penyari. Pada umumnya penyarian akan bertambah baik apabila permukaan serbuk simplisia yang bersentuhan dengan penyari semakin luas (Anonim, 1986).

Cara penyarian dapat dibedakan menjadi infundasi, soxhletasi, maserasi dan perkolasi (Anonim, 1986).

#### **a. Infundasi**

Infusa adalah sediaan cair yang dibuat dengan menyari simplisia dengan air pada suhu  $90^{\circ}\text{C}$  selama 15 menit. Infundasi adalah proses penyarian yang umumnya digunakan untuk menyari zat kandungan aktif yang larut dalam air dari bahan-bahan nabati. Penyarian dengan cara ini menghasilkan sari yang tidak stabil dan mudah tercemar oleh kuman dan kapang. Oleh sebab itu sari yang diperoleh dengan cara ini tidak boleh disimpan lebih dari 24 jam (Anonim, 1986).

#### **b. Soxhletasi**

Cairan penyari diisikan pada labu, serbuk simplisia diisikan pada tabung dan kertas saring atau tabung yang berlubang-lubang dari gelas, baja tahan karat, atau bahan lain yang cocok. Cairan penyari dipanaskan hingga mendidih. Uap cairan penyari naik ke atas melalui pipa samping, kemudian diembunkan kembali oleh pendingin tegak. Cairan turun ke labu melalui tabung yang berisi serbuk simplisia cairan penyari sambil turun melarutkan zat aktif serbuk simplisia karena adanya

sifon maka setelah cairan mencapai permukaan sifon, seluruh cairan akan kembali ke labu.

Keuntungan menggunakan alat soxhlet:

1. Cairan penyari yang diperlukan lebih sedikit dan segera langsung diperoleh hasil yang lebih pekat.
2. Serbuk simplisia disari oleh cairan penyari yang murni, sehingga dapat menyari zat aktif lebih banyak.
3. Penyarian dapat diteruskan sesuai dengan keperluan tanpa menambah volume cairan penyari.

Kerugian menggunakan alat soxhlet:

1. Larutan dipanaskan terus-menerus, sehingga zat aktif yang tidak tahan pemanasan kurang cocok. Ini dapat diperbaiki dengan menambahkan peralatan untuk mengurangi tekanan udara.
2. Cairan penyari dididihkan terus-menerus, sehingga cairan penyari yang baik harus murni atau campuran azeotrop (Anonim, 1986).

### **c. Maserasi**

Maserasi adalah cara ekstraksi yang sederhana. Maserasi dilakukan dengan cara merendam serbuk simplisia dalam cairan penyari. Cairan penyari akan menembus dinding sel dan masuk ke dalam rongga sel yang mengandung zat aktif, zat aktif akan larut dan karena adanya perbedaan konsentrasi antara larutan zat aktif di dalam sel dengan yang di luar sel, maka larutan yang terpekat didesak



keluar. Peristiwa tersebut berulang sehingga terjadi keseimbangan konsentrasi antara larutan di luar sel dan di dalam sel. Maserasi pada umumnya dilakukan dengan cara: sepuluh bagian simplisia dengan derajat halus yang cocok dimasukkan ke dalam bejana, kemudian dituangi dengan 75 bagian cairan penyari, ditutup dan dibiarkan selama 5 hari terlindung dari cahaya, sambil berulang-ulang diaduk. Selama 5 hari serbuk diserikai, ampas diperas. Ampas ditambah cairan penyari secukupnya diaduk dan diserikai, sehingga diperoleh seluruh sari sebanyak 100 bagian (Anonim, 1986).

Keuntungan cara penyarian dengan maserasi adalah cara pengerjaan dan peralatan yang dipergunakan sederhana dan mudah diusahakan, sementara kerugian cara maserasi adalah pengerjaannya lama dan penyariannya kurang sempurna (Anonim, 1986).

Modifikasi yang dilakukan pada maserasi diantaranya adalah remaserasi. Remaserasi yaitu cairan penyari dibagi 2. Seluruh serbuk simplisia dimaserasi dengan cairan penyari pertama, sesudah dienaptuangkan dan diperas, ampas dimaserasi lagi dengan cairan penyari yang kedua (Anonim, 1986).

#### **d. Perkolasi**

Perkolasi adalah cara penyarian yang dilakukan dengan mengalirkan cairan penyari melalui serbuk simplisia yang telah dibasahi. Kekuatan yang berperan dalam perkolasi antara lain gaya berat, daya larut, tegangan permukaan, difusi, osmosa, adesi, daya kapiler dan gaya gesekan (friksi) (Anonim, 1986).

Perkolasi dilakukan dalam wadah berbentuk silindris atau kerucut (*percolator*) yang memiliki jalan masuk dan keluar yang sesuai. Bahan pengekstraksi dialirkan secara berkesinambungan diatas, mengalir turun secara lambat melintasi simplisia yang umumnya berupa serbuk kasar. Melalui penyegaran bahan pelarut secara berkesinambungan akan terjadi proses maserasi berulang-ulang. Jika pada maserasi sederhana, terjadi ekstraksi yang sempurna dari simplisia, karena akan terjadi keseimbangan konsentrasi antara larutan dalam sel dengan cairan disekelilingnya. Pada perkolasi melalui suplai bahan pelarut segar, perbedaan konsentrasi tidak selalu dipertahankan, sehingga terjadi ekstraksi yang sempurna (Voight, 1995).

#### **4. Kromatografi Lapis Tipis**

Kromatografi merupakan metode pemisahan yang berbeda dengan cara pemisahan yang berdasar kimia dan fisika atau pemisahan cair-cair. Pemisahan yang terjadi pada kromatografi menggunakan dua fase yang tidak tercampur tetapi selalu dalam satu sistem yang bercampur, yang dinamakan fase gerak dan fase diam yang umumnya berupa zat padat atau zat cair yang didukung oleh zat padat (Sumarno, 2001).

Kromatografi lapis tipis digunakan pada pemisahan zat secara cepat, dengan menggunakan zat penyerap berupa serbuk halus yang dilapiskan serba rata pada lempeng kaca. Lempeng yang dilapis dapat dianggap sebagai kolom kromatografi terbuka dan pemisahan didasarkan pada penyerapan, pembagian atau gabungannya,

tergantung dari jenis zat penyerap dan cara pembuatan lapisan zat penyerap dan jenis pelarut. Kromatografi lapis tipis dengan penyerap penukar ion dapat digunakan untuk pemisahan senyawa polar. Harga  $R_f$  yang diperoleh pada kromatografi lapis tipis, tidak tetap jika dibandingkan dengan yang diperoleh pada kromatografi kertas. Karena itu pada lempeng yang sama disamping kromatogram dari zat pembanding kimia, lebih baik dengan kadar yang berbeda-beda. Perkiraan identifikasi diperoleh dengan pengamatan 2 bercak dengan harga  $R_f$  dan ukuran yang lebih kurang sama. Ukuran dan identitas bercak dapat digunakan untuk memperkirakan kadar (Anonim, 1995).

Kromatografi lapis tipis ini dikembangkan tahun 1938 oleh Ismailoff dan Schraiber. Adsorben dilapiskan pada lempeng kaca yang bertindak sebagai penunjang fase diam. Fase bergerak akan menyerap sepanjang fase diam dan terbentuklah kromatogram. Ini dikenal juga sebagai kromatografi kolom terbuka. Metode ini sederhana, cepat dalam pemisahan dan sensitif, kecepatan pemisahan tinggi dan mudah untuk memperoleh kembali senyawa-senyawa yang terpisahkan (Khopkar, 1990).

Dengan memakai kromatografi lapis tipis, pemisahan senyawa yang amat berbeda seperti senyawa organik alam dan senyawa organik sintetik, kompleks anorganik-organik, dan bahkan ion anorganik, dapat dilakukan dalam beberapa menit dengan alat yang harganya tidak terlalu mahal. Jumlah cuplikan serendah beberapa mikrogram atau setinggi 5 g dapat ditangani, bergantung pada alat yang ada dan

gejala kromatografi yang terlibat. Kelebihan kromatografi lapis tipis yang lain ialah pemakaian pelarut dan cuplikan yang jumlahnya sedikit, kemungkinan penotolan cuplikan berganda (saling membandingkan langsung cuplikan praktis), dan tersedianya berbagai metode (seperti kromatografi cair-padat, kromatografi cair-cair dan kromatografi eksklusif) (Gritter, 1991).

Kromatografi lapis tipis dapat dipakai dengan dua tujuan. Pertama, dipakai selayaknya sebagai metode untuk mencapai hasil kualitatif, kuantitatif, atau preparatif. Kedua, dipakai untuk menjajaki sistem pelarut dan sistem penyangga yang akan dipakai dalam kromatografi kolom atau kromatografi cair kinerja tinggi (Gritter, 1991).

Beberapa istilah yang digunakan dalam kromatografi lapis tipis. Fase diam pada kromatografi lapis tipis berupa fase yang polar (fase normal) seperti: silika gel, alumina (aluminium oksida), kiselguhr, magnesium silikat dan selulose, maupun fase non polar (fase terbalik) seperti: fase diam dari silika dan resin. Fase gerak baik tunggal maupun campuran pemilihannya tergantung pada solut yang dianalisis dan fase diam yang digunakan. Bila fase diam telah ditentukan maka memilih fase gerak dapat berpedoman pada kekuatan elusi fase gerak tersebut (Sumarno, 2001). Titik tempat campuran ditotolkan pada ujung pelat atau lembaran disebut titik awal dan cara menempatkan cuplikan disebut penotolan. Garis depan pelarut adalah bagian atas fase gerak atau pelarut ketika ia bergerak melalui lapisan, dan setelah

pengembang selesai, merupakan tinggi maksimum yang dicapai oleh pelarut (Gritter, 1991).

Jarak pengembangan senyawa pada kromatogram biasanya dinyatakan dengan angka Rf atau hRf angka Rf berjangka antara 0,00 dan 1,00 dan hanya dapat ditentukan dua desimal. hRf ialah angka Rf dikalikan faktor 100 (h), menghasilkan nilai berjangka 0 sampai 100, jika dipilih 10 cm sebagai jarak pengembangan, maka jarak rambat suatu senyawa (titik awal – pusat bercak dalam cm) x 10 menghasilkan angka hRf. Tetapi, karena angka Rf merupakan fungsi sejumlah faktor, angka ini harus dianggap sebagai petunjuk saja (Stahl, 1985).

Dalam mengidentifikasi noda-noda dalam lempeng sangat lazim menggunakan harga Rf (*retardation factor*):

$$Rf = \frac{\text{Jarak yang ditempuh senyawa terlarut}}{\text{Jarak yang ditempuh pelarut}}$$

(Sudjadi, 1988).

Faktor-faktor yang mempengaruhi gerakan dalam kromatografi lapis tipis yang juga mempengaruhi harga Rf:

1. Struktur kimia dari senyawa yang dipisahkan
2. Sifat dari fase diam
3. Tebal dan kelarutan dari fase diam
4. Pelarut fase gerak
5. Kejenuhan dari uap dalam bejana pengembangan
6. Jumlah cuplikan yang digunakan

7. Suhu (Sastrohamidjojo, 1991).

## 5. Spektrofotometri Ultraviolet

### a. Tinjauan umum

Spektrofotometri adalah pengukuran serapan radiasi elektromagnet panjang gelombang tertentu yang sempit, mendekati monokromatik, yang diserap zat. Pengukuran serapan dapat dilakukan pada daerah ultraviolet (panjang gelombang 190 nm – 380 nm). Meskipun spektrum pada daerah ultraviolet dan daerah cahaya tampak dari suatu zat tidak khas, tetapi sangat cocok untuk penetapan kuantitatif, dan untuk beberapa zat berguna untuk membantu identifikasi (Anonim, 1979).

Untuk melukiskan bagaimana radiasi elektromagnetik berinteraksi dengan benda, adalah perlu memikirkan berkas sinar sebagai foton. Tenaga setiap foton berbanding langsung dengan frekuensi radiasi dan hal ini dinyatakan dalam persamaan:

$$E = h \cdot \nu = h \cdot c / \lambda$$

Dimana E = tenaga foton dalam erg;  $\nu$  = frekuensi radiasi elektromagnetik dalam hertz; dan h = tetapan Planck  $6,624 \times 10^{-24}$  J-detik. Foton yang memiliki frekuensi yang tinggi (panjang gelombang pendek) mempunyai tenaga yang lebih tinggi daripada foton yang berfrekuensi rendah (panjang gelombang panjang) (Sastrohamidjojo, 2001).

Semua gugus atau gugusan atom yang mengabsorpsi radiasi UV-Vis yang disebut sebagai kromofor. Pada senyawa organik dikenal pula gugus auksokrom,

adalah gugus fungsional yang mempunyai elektron bebas seperti  $-\text{OH}$  ;  $\text{O}-\text{NH}_2$  dan  $\text{O}-\text{CH}_3$ . Terikatnya gugus auksokrom oleh gugus kromofor akan mengakibatkan pergeseran pita absorpsi menuju ke panjang gelombang yang lebih panjang (pergeseran merah = batokromik) disertai peningkatan intensitas (efek hiperkromik) (Mulja dan Suharman, 1995).

#### **b. Spektrofotometri UV untuk flavonoid**

Spektrofotometri serapan ultraviolet dan serapan tampak barangkali merupakan cara tunggal yang paling berguna untuk menganalisis struktur flavonoid. Cara tersebut digunakan untuk membantu mengidentifikasi jenis flavonoid dan menentukan pola oksigenasi. Disamping itu kedudukan gugus hidroksil fenol bebas pada inti flavonoid dapat ditentukan dengan menambahkan pereaksi (pereaksi geser) ke dalam larutan cuplikan dan mengamati pergeseran puncak serapan yang terjadi. Dengan demikian, secara tidak langsung cara ini berguna untuk menentukan kedudukan gula atau metil yang terikat pada salah satu gugus hidroksil fenol (Markham, 1988).

Spektrum flavonoid biasanya ditentukan dalam larutan dengan pelarut metanol atau etanol ( $\text{EtOH}$ ), meski perlu diingat bahwa spektrum yang dihasilkan dalam etanol kurang memuaskan. Spektrum khas terdiri atas dua maksimal pada rentang 240–285 nm (pita II) dan 300–550 nm (pita I) (Markham, 1988). Rentangan serapan spektrum UV – tampak flavonoid dapat dilihat pada tabel V.

**Tabel V. Rentang serapan spektrum UV- tampak flavonoid (Markham, 1998)**

Pita II (nm)	Pita I (nm)	Jenis flavonoid
250 - 280	310 - 350	Flavon
250 - 280	330 - 360	Flavonol (3-OH tersubstitusi)
250 - 280	350 - 385	Flavonol (3-OH bebas)
245 - 275	310 - 330 bahu	Isoflavon
275 - 295	300 - 330 bahu	Flavonon dan dihidroflavonol
230 - 270	340 - 390	Khalkon
(kekuatan rendah) 230 - 270	380 - 430	Auron
(kekuatan rendah) 270 - 280	465 - 560	Antosianidin dan Antosianin

### c. Pereaksi geser

#### Flavon dan flavonol

##### 1. Efek hidroksilasi

Penambahan gugus OH pada cincin A pada flavon atau flavonol menghasilkan pergeseran batokromik yang nyata pada pita resapan I atau pita resapan II pada spektra flavonoid. Apabila gugus hidroksi tidak ada pada flavon atau flavonol, panjang gelombang maksimal muncul pada panjang gelombang yang lebih pendek jika dibanding jika ada gugus 5-OH. Sedangkan substitusi gugus hidroksi pada posisi 3, 5, 4' mempunyai sedikit efek atau tidak sama sekali pada spektra ultraviolet (Mabry, *et al.*, 1970).

##### 2. Efek metilasi dan glikosilasi

Metilasi dan glikosilasi pada pola resapan dari flavon dan flavonol termetilasi atau terglisosilasi terjadi pergeseran hipsokromik, khususnya



dapat dilihat pada pita serapan I. Pergeseran yang terjadi sebesar 12–17 nm. Dapat juga mencapai 22–25 nm pada flavon yang tidak mempunyai gugus 5–OH (Mabry, *et al.*, 1970).

### 3. Efek natrium metoksida

Natrium metoksida pada flavon dan flavonol dalam metanol pada umumnya menghasilkan pergeseran batokromik yang pada semua pita serapan. Walaupun demikian pergeseran batokromik yang besar pada serapan pita I sekitar 40–65 nm tanpa penurunan intensitas, menunjukkan adanya gugus-gugus 4'-OH bebas dan flavonol yang tidak mempunyai gugus 4'-OH bebas juga memberikan pergeseran batokromik disebabkan adanya gugus 3–OH. Jika suatu flavonol mempunyai 3 dan 4'-OH bebas, maka spektranya dengan natrium metoksida akan mengalami dekomposisi. Pereaksi pengganti natrium metoksida yang cocok ialah larutan NaOH 2M dalam air (Mabry, *et al.*, 1970).

### 4. Efek natrium asetat

Natrium asetat merupakan basa lemah dan hanya akan mengionisasi gugus yang sifat keasamannya tinggi, khususnya untuk mendeteksi adanya gugus 7–OH bebas (Markham, 1988). Flavon dan flavonol yang mempunyai gugus 7–OH bebas menunjukkan pergeseran batokromik sebesar 5–20 nm pada pita serapan II dengan adanya natrium asetat. Natrium asetat hanya dapat mengionisasi khusus pada gugus 7–OH. Adanya natrium asetat dan asam

borat akan membentuk kompleks dengan gugus orto dihidroksi pada semua posisi kecuali atom  $C_5$  dan  $C_6$ . Flavon dan flavonol yang mempunyai gugus orto dihidroksi pada cincin B menunjukkan pergeseran batokromik pada serapan I sebesar 12–30 nm. Gugus orto dihidroksi pada cincin A juga dapat dideteksi dengan efek natrium asetat dan asam borat. Adanya pergeseran batokromik sebesar 5–10 nm pada pita I menunjukkan adanya gugus orto dihidroksi pada  $C_6$  dan  $C_7$  atau  $C_7$  dan  $C_8$  (Mabry, *et al.*, 1970).

#### 5. Efek $AlCl_3$

Karena membentuk kompleks tahan asam antara gugus hidroksil dan keton yang bertetangga dan membentuk kompleks tak tahan asam dengan gugus orto, pereaksi ini dapat digunakan untuk mendeteksi kedua gugus tersebut (Markham, 1988). Gugus OH pada  $C_3$  dan  $C_5$  pada flavon dan flavonol akan membentuk kompleks yang stabil dengan adanya  $AlCl_3$ . Sebaliknya kompleks yang terbentuk antara  $AlCl_3$  dengan gugus orto dihidroksi bersifat labil sehingga dengan penambahan asam akan terdekomposisi sedangkan kompleks antara  $AlCl_3$  dengan C-4 keto dan 3 atau 5-OH tetap stabil dengan adanya asam. Adanya gugus orto dihidroksi pada cincin B dapat diketahui jika pada penambahan asam terhadap spektra kompleks  $AlCl_3$  menghasilkan pergeseran hipsokromik sebesar 30–40 nm pada pita I

(atau pita Ia jika pita I terdiri dari 2 puncak). Dengan adanya pergeseran batokromik pada pita Ia (dalam  $\text{AlCl}_3$  /  $\text{HCl}$ ) dibandingkan dengan pita I (dalam metanol) 35–55 nm, menunjukkan adanya 5–OH flavon atau flavonol 3–OH tersubstitusi (Mabry, *et al.*, 1970).

### **Isoflavon, flavanon dan dihidroflavonol**

Spektra ultraviolet isoflavon, flavanon, dan dihidroflavonol dalam metanol memberikan bentuk yang mirip antara satu dan yang lainnya. Senyawa golongan ini sedikit atau tidak mengalami konjugasi antara cincin A dan B. Spektra mereka sangat berbeda dengan flavon dan flavonol, pita serapan I, mempunyai intensitas yang lemah atau bahu sedangkan pita II intensitasnya kuat. Pita serapan II dari isoflavon biasanya antara 245–270 nm dan relatif tidak mempunyai efek pada cincin B dengan adanya hidroksilasi, sementara pita serapan II dari flavanon dan dihidroflavonol antara 270–295 nm (Mabry, *et al.*, 1970).

#### **1. Natrium metoksida**

Dengan penambahan natrium metoksida spektra isoflavon yang mempunyai gugus OH pada cincin A akan memperlihatkan pergeseran batokromik baik pada pita I maupun pita II. Puncak pada spektra ultraviolet senyawa 3', 4' – dihidroksi isoflavon dapat digunakan untuk menentukan bahwa dekomposisi yang berjalan cepat yang menunjukkan adanya 3', 4'–dihidroksi isoflavon (Mabry, *et al.*, 1970).

## 2. Natrium asetat

Natrium asetat hanya dapat mengionisasi isoflavon khususnya pada gugus 7–OH. Gugus 3' atau 4'–OH pada isoflavon tidak dapat terionisasi, berbeda dengan kebanyakan flavon dan flavonol. Oleh sebab itu interpretasi terhadap pergeseran spektra isoflavon untuk penambahan natrium asetat menjadi sederhana. Adanya 7–OH isoflavon menyebabkan pergeseran batokromik 6–20 nm pada pita II setelah penambahan natrium asetat (Mabry, *et al.*, 1970).

## 3. Natrium asetat atau asam borat

Gugus ortodihidroksi pada cincin B tak dapat dideteksi dengan NaOAc /  $H_3BO_3$  pada spektra UV isoflavon, flavanon, dihidroflavonol karena kurang efektifnya konjugasi dengan kromofor utama. Meskipun demikian ada fakta yang menunjukkan bahwa gugus 6, 7 dihidroksi pada cincin A isoflavon dan flavanon (mungkin juga dihidroflavonol) dapat dideteksi dengan adanya pergeseran batokromik 10–15 nm pada pita I setelah penambahan NaOAc atau  $H_3BO_3$  (Mabry, *et al.*, 1970).

## 4. $AlCl_3$ dan $AlCl_3$ atau HCl

Adanya gugus 3', 4'–dihidroksi pada isoflavon, flavanon dan dihidroflavonol tidak dapat dideteksi dengan  $AlCl_3$  karena cincin B mempunyai sedikit atau tidak ada konjugasi dengan kromofor utama. Jika isoflavon, flavanon (dan mungkin dihidroflavonol) mengandung gugus ortodihidroksi pada posisi 6,

7 atau 7, 8 maka spektra  $\text{AlCl}_3$  menunjukkan pergeseran batokromik (biasanya pita I maupun pada pita II) dengan membandingkan terhadap spektra  $\text{AlCl}_3$  atau HCl. Pita serapan II spektra ultraviolet dari semua 5-OH isoflavon, flavanon dan dihidroflavonol dapat dideteksi dengan penambahan  $\text{AlCl}_3$  atau HCl kecuali 2-karboksi; 5, 7-dihidroksi isoflavon. Adanya gugus tersebut ditandai dengan pergeseran batokromik pada pita II 10–14 nm (relatif terhadap metanol). Spektra isoflavon, flavanon dan dihidroflavonol yang tidak mempunyai gugus 5-OH bebas tidak berefek setelah penambahan  $\text{AlCl}_3$  atau HCl (Mabry, *et al.*, 1970).

#### **D. Hipotesis**

Flavonoid yang terkandung dalam daun ceremai (*Phyllanthus acidus* [L.] Skeels.) dapat diisolasi secara kromatografi lapis tipis dan diidentifikasi struktur parsialnya berdasarkan data kromatogram, reaksi warna dan spektrofotometri ultraviolet.